

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
18 septembre 2003 (18.09.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/076942 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>2</sup> :

G01N 33/574

[FR/FR]; 371 Avenue du Doyen Gaston Giraud, F-34000  
Montpellier (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR03/00806

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : VEN-  
DRELL, Jean-Pierre [FR/FR]; 133 chemin des Man-  
drous, F-34170 Catelnau-le-lez (FR). PANABIERES,  
Catherine [FR/FR]; 4A du Maréchal Leclerc, F-67150  
Nordhouse (FR). CHOQUET-KASTYLEVSKY,  
Geneviève [FR/FR]; 28 Avenue du Bois, F-69500 Bron  
(FR). JOLIVET, Michel [FR/FR]; 29 Route Nationale,  
F-69720 Saint Bonnet de Mure (FR).

(22) Date de dépôt international : 13 mars 2003 (13.03.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

02/03136

13 mars 2002 (13.03.2002) FR

(74) Mandataire : CABINET GERMAIN & MAUREAU;  
Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
BIOMERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280  
Marcy-l'Etoile (FR). CENTRE HOSPITALIER UNI-  
VERSITAIRE DE MONTPELLIER LABORATOIRE  
DE VIROLOGIE DE L'HOPITAL LAPEYRONIE

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR THE DETECTION AND/OR CHARACTERISATION OF CIRCULATING TUMOUR CELLS AND THE USE THEREOF IN THE EARLY DIAGNOSIS, PROGNOSIS AND DIAGNOSIS OF RELAPSES AND IN THE SELECTION AND EVALUATION OF THERAPEUTIC TREATMENTS

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION ET/OU QUANTIFICATION DE CELLULES TUMORALES CIRCULANTES ET SON UTILISATION DANS LE DIAGNOSTIC PRECOCE, LE PRONOSTIC ET LE DIAGNOSTIC DES RECHUTES ET DANS LE CHOIX ET L'EVALUATION DES TRAITEMENTS THERAPEUTIQUES

(57) Abstract: The invention relates to a method for the detection and/or characterisation of circulating tumour cells, in a biological sample from a patient suffering from solid cancer, which can release or secrete *in vitro* one or more tumour markers. The inventive method consists in: (i) depositing a known quantity of the aforementioned cells at the bottom of a culture surface to which at least one specific binding partner of the tumour marker(s) is fixed, (ii) cultivating said cells in conditions such that they release or secrete the aforementioned tumour markers which are immunocaptured at the bottom of the culture surface, (iii) eliminating the cells by washing, (iv) adding at least one specific labelled conjugate of said tumour markers, and (v) viewing the labelling thus obtained. The invention also relates to the use of the inventive method in the early diagnosis and prognosis of the pathology, in the selection and evaluation of the effectiveness of therapeutic treatments and in the diagnosis of relapses in relation to solid cancers. Moreover, the invention relates to diagnostic kits comprising a culture surface that has been coated with one or more binding partners of the specific tumour markers of the cancer being studied and the corresponding previously-labelled conjugate(s).

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de détection et/ou quantification de cellules tumorales circulantes d'un échantillon biologique d'un patient atteint de cancer solide, lesquelles sont capables de relarguer ou sécréter *in vitro* un ou plusieurs marqueurs tumoraux, comprenant les étapes consistant à (i) déposer une quantité connue desdites cellules au fond d'une surface de culture sur laquelle est fixé au moins un partenaire de liaison spécifique dudit ou desdits marqueurs tumoraux, (ii) cultiver lesdites cellules en conditions telles qu'elles relarguent ou sécrètent lesdits marqueurs tumoraux qui sont immunocapturés au fond de ladite surface de culture, (iii) éliminer les cellules par lavage, (iv) ajouter au moins un conjugué marqué spécifique desdits marqueurs tumoraux et visualiser le marquage ainsi obtenu. Elle concerne également l'utilisation dudit procédé dans le diagnostic précoce et le pronostic de la pathologie, dans le choix et l'évaluation de l'efficacité des traitements thérapeutiques et dans le diagnostic des rechutes dans le cadre de cancers solides, ainsi que les kits de diagnostic comprenant une surface de culture préalablement revêtue d'un ou plusieurs partenaires de liaison des marqueurs tumoraux spécifiques du cancer dont on veut effectuer la recherche et le ou les conjugués correspondants préalablement marqués.

BEST AVAILABLE COPY

**Procédé de détection et/ou quantification de cellules tumorales circulantes et son utilisation dans le diagnostic précoce, le pronostic et le diagnostic des rechutes et dans le choix et l'évaluation des traitements thérapeutiques**

5 La présente invention concerne le domaine du diagnostic biologique en oncologie. Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un procédé de détection et/ou quantification de cellules tumorales circulantes capables de relarguer ou sécréter *in vitro* un ou plusieurs marqueurs tumoraux, ainsi que l'utilisation de ce procédé dans le diagnostic précoce et le pronostic de la pathologie, dans le choix des  
10 traitements thérapeutiques et l'évaluation de leur efficacité, ainsi que dans le diagnostic des rechutes dans le cadre de cancers solides.

Le diagnostic actuel de cancers consiste en un diagnostic clinique, tel que palpation mammaire dans le cas du cancer du sein, et/ou un examen paraclinique, tel que mammographie, scanner, la confirmation étant effectuée par une analyse  
15 histologique telle que biopsie ou intervention chirurgicale.

Le diagnostic clinique ou paraclinique précoce du cancer est difficile, notamment du fait du manque d'accessibilité anatomique des zones cancéreuses. En conséquence, de nombreuses tumeurs ne sont généralement mises en évidence que  
tardivement.

20 Le même problème se rencontre lorsque les zones sont anatomiquement accessibles. Par exemple, dans le cas du cancer du sein, lorsque qu'une tumeur est détectée au cours d'une mammographie, elle a souvent une évolution infraclinique de 8 ans en moyenne.

A l'heure actuelle, il n'existe pas ou peu de méthode diagnostique  
25 biologique permettant à elles seules le diagnostic de cancer.

Les méthodes de diagnostic biologique actuellement développées permettent de suivre l'évolution d'un cancer déjà diagnostiqué ou de dépister une récurrence, par exemple par dosage de certains marqueurs tumoraux. Ainsi sont dosés des marqueurs sériques ou urinaires par des techniques bien connues de l'homme du métier.

30 En revanche, la détection directe de cellules tumorales circulantes est peu explorée et il n'existe pas de test de routine.

De plus, aucune des méthodes précédemment citées ne permet de s'assurer de la viabilité des cellules circulantes et de leur potentiel de survie.

Cordoba F., et al. (2000, British Journal of Haematology, 108, 549-558) ont décrit un procédé de détection de cellules myélomateuses de patients atteints d'un myélome multiple en utilisant la propriété connue de ces cellules à sécréter de l'immunoglobuline. Les cellules myélomateuses sont issues de lymphocytes B normalement présents dans le sang et normalement sécréteurs d'immunoglobulines.

La Demanderesse a maintenant trouvé de manière surprenante que les cellules tumorales circulantes issues de cancers solides étaient capables de relarguer ou sécréter certains marqueurs tumoraux et qu'il était possible de détecter cette sécrétion.

La demanderesse a ainsi mis au point un nouveau procédé de détection et/ou quantification de cellules tumorales circulantes issues de cancers solides utilisant cette caractéristique particulière de relargage ou sécrétion de marqueurs tumoraux et palliant les inconvénients ci-dessus, à savoir qu'il est simple à mettre en œuvre en ce sens qu'il ne comporte qu'une seule étape d'analyse et qu'il ne nécessite pas de matériel spécifique. De plus, ce procédé permet de détecter des cellules circulantes rares du fait de sa sensibilité très élevée et permet également de s'assurer de la viabilité desdites cellules tumorales. Il est donc très utile tant en diagnostic qu'en exploration de la maladie résiduelle et qu'en évaluation du potentiel de survie, donc d'agressivité, de ces cellules circulantes.

Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé de détection et/ou quantification de cellules tumorales circulantes d'un échantillon biologique, lesquelles sont capables de relarguer ou sécréter *in vitro* un ou plusieurs marqueurs tumoraux, comprenant les étapes consistant à :

- (i) déposer une quantité connue desdites cellules au fond d'une surface de culture sur laquelle est fixé au moins un partenaire de liaison spécifique dudit ou desdits marqueurs tumoraux,
- (ii) cultiver lesdites cellules en conditions telles qu'elles relarguent ou sécrètent lesdits marqueurs tumoraux qui sont immunocapturés au fond de la surface de culture,
- (iii) éliminer les cellules par lavage,

A titre d'exemple d'antigène sécrété, on peut citer le PSA qui est produit par les cellules du cancer de la prostate, la protéine cathépsine-D (Cath-D) qui est une aspartyl protéase du lysosome exprimée dans tous les tissus mais qui est surexprimée par les cellules cancéreuses dans le cadre du cancer du sein, la thyroglobuline (TG) produite par les cellules cancéreuses dans le cadre du cancer de la thyroïde, la protéine CA 125 produite par les cellules cancéreuses dans le cadre du cancer de l'ovaire, les protéines ACE et CA 19-9 produite par les cellules cancéreuses dans le cadre du cancer colorectal et l'alpha foetoprotéine (AFP) produite par les cellules hépatiques dans le cadre des hépatocarcinomes.

10 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les cellules tumorales sont capables de relarguer comme marqueur tumoral la protéine CA15-3 et le cancer recherché est le cancer du sein.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, les cellules tumorales sont capables de sécréter comme marqueur tumoral la protéine TG et le cancer recherché est le cancer de la thyroïde.

15 Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, les cellules tumorales sont capables de re-sécréter comme marqueur tumoral la protéine CA 125 et le cancer recherché est le cancer de l'ovaire.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, les cellules tumorales sont capables de sécréter comme marqueur tumoral les protéines ACE et CA 19-9 et le cancer recherché est le cancer colorectal.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, les cellules tumorales sont capables de sécréter comme marqueur tumoral l'alpha foetoprotéine et le cancer recherché est le cancer primaire du foie.

25 Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, les cellules tumorales sont capables de sécréter comme marqueur tumoral le PSA et le cancer recherché est le cancer de la prostate.

Les partenaires de liaison spécifiques des marqueurs tumoraux sont constitués par tout partenaire susceptible de se lier avec les marqueurs tumoraux. A titre d'exemple, on peut citer les anticorps, les fractions d'anticorps et les protéines.

30 Les anticorps partenaires de liaison sont soit des anticorps polyclonaux, soit

Dans le cas du cancer de la prostate où les cellules sont capables de sécréter le PSA, on pourra utiliser, comme partenaire de liaison, des anticorps anti-PSA.

Dans le cas du cancer de la thyroïde où les cellules sont capables de sécréter de la TG, on pourra utiliser, comme partenaire de liaison, des anticorps anti-TG.

Dans le cas du cancer de l'ovaire où les cellules sont capables de sécréter du CA 125, on pourra utiliser, comme partenaire de liaison, des anticorps anti-CA 125.

Dans le cas du cancer colorectal où les cellules sont capables de sécréter du CA 19-9 ou de l'ACE, on pourra utiliser, comme partenaire de liaison, des anticorps anti-CA 19-9 et anti-ACE.

Dans le cas de l'hépatocarcinome où les cellules sont capables de sécréter de l'alpha foetoprotéine, on pourra utiliser, comme partenaire de liaison, des anticorps anti-AFP.

La surface de culture peut contenir plusieurs partenaires de liaison. De préférence, la surface de culture contient jusqu'à quatre partenaires de liaison différents.

Selon un mode de réalisation préféré, la surface de culture contient deux types d'anticorps différents dirigés contre des antigènes spécifiques du cancer du sein, de préférence les anticorps anti-CA15-3 et anti-Cath-D.

La surface de culture est telle qu'elle permet la culture de cellules tumorales. A titre d'exemple, on peut citer les micropuits, les microplaques, les surfaces plastiques et les membranes.

Le micropuits ou la microplaque eux-mêmes peuvent être constitués de plastique de sorte que les partenaires de liaison sont fixés directement au micropuits ou à la microplaque. Ils peuvent également contenir une membrane classiquement connue de l'homme du métier, laquelle est susceptible de fixer les partenaires de l'invention. A titre d'exemple, on peut citer les membranes en nitrocellulose et en Immobilon-P (Millipore Corporation).

L'échantillon biologique de patients d'intérêt est déposé directement au fond de la surface de culture ou bien les cellules non hémapoïétiques sont enrichies avant dépôt sur ledit fond.

ligands capables de réagir avec un anti-ligand. Les couples ligand/anti-ligand sont bien connus de l'homme du métier, ce qui est le cas par exemple des couples suivants : biotine/streptavidine, haptène/anticorps, antigène/anticorps, peptide/anticorps, sucre/lectine, polynucléotide/complémentaire du polynucléotide. Dans ce cas, c'est le  
5 ligand qui porte l'agent de liaison. L'anti-ligand peut être détectable directement par les marqueurs décrits au paragraphe précédent ou être lui-même détectable par un ligand/anti-ligand.

Ces systèmes de détection indirects peuvent conduire, dans certaines conditions, à une amplification du signal. Cette technique d'amplification du signal est  
10 bien connue de l'homme du métier, et l'on pourra se reporter aux demandes de brevet antérieures FR98/10084 ou WO-A-95/08000 de la demanderesse ou à l'article J. Histochem. Cytochem. 45 : 481-491, 1997.

Selon le type de marquage du conjugué utilisé, l'homme du métier ajoutera des réactifs permettant la visualisation du marquage.

15 Ainsi, par exemple, dans le cas des enzymes, il est nécessaire d'ajouter un substrat chromogène, tel que le NBT-BCPI pour la phosphatase alcaline ou l'AEC pour la peroxydase. L'addition du substrat chromogène laisse alors apparaître à l'endroit où se trouvait une cellule cible un précipité coloré ou immuno-spot (bleu avec le NBT-BCIP et rouge avec l'AEC), véritable empreinte protéique laissée par la cellule.

20 L'ensemble des immuno-spots présents au fond de la surface de culture peut être visualisé et dénombré à la loupe binoculaire ou mieux à l'aide de l'appareillage KS ELISPOT (Société Carl Zeiss Vision GmbH) équipé d'un microscope performant et d'une caméra numérique couplés à un système informatique.

Pour le marquage en fluorescence, l'ensemble des immunospots est  
25 visualisé et dénombré avec l'appareillage KS ELISPOT adapté à l'étude de la fluorescence.

Les critères retenus pour l'analyse de ces spots incluent le diamètre, la couleur, la forme, la saturation, le contraste et le gradient de diffusion. En effet, la densité et la granulosité des spots décroît du centre vers la périphérie suivant un  
30 gradient de diffusion très caractéristique d'une synthèse protéique.

Un autre objet de l'invention consiste donc en l'utilisation du procédé de l'invention pour évaluer le potentiel de survie des cellules tumorales circulantes issues de patients atteints de cancers solides.

En effet, un résultat positif du procédé de l'invention met en évidence un tel potentiel de survie.

Le procédé de l'invention peut être mis en œuvre grâce à un kit de diagnostic comprenant une surface de culture préalablement revêtue d'un ou plusieurs partenaires de liaison des marqueurs tumoraux spécifiques du cancer dont on veut effectuer la recherche, le ou les conjugués correspondants préalablement marqués. Le kit peut également contenir les solutions pour le lavage drastique des cellules après immunocapture.

Bien entendu, le procédé de l'invention peut être utilisé pour dénombrer toute cellule tumorale circulante capable de relarguer ou sécréter au moins un marqueur identifié comme marqueur tumoral pour lequel il existe un partenaire spécifique de liaison.

Ainsi, par exemple, le procédé de l'invention permet de dénombrer :

- des cellules thyroïdiennes tumorales productrices de thyroglobuline (TG) ou de calcitonine (CT),
- des cellules hépatiques tumorales productrices d'alpha-foetoprotéines (AFP),
- des cellules testiculaires tumorales productrices d'AFP ou d'hormone chorionique gonadotrope (bêta-HCG),
- des cellules mammaires tumorales productrices de CA15-3, de cathépsine D, de PS2, d'Her2/neu, de mammaglobine B,
- des cellules ovariennes tumorales productrices de CA-125,
- des cellules prostatiques tumorales productrices de PSA,
- des cellules tumorales du système digestif (colon, rectum, estomac et pancréas) productrices de CA19-9, CA-125, de CA 19-9 et d'ACE, et
- des cellules tumorales du mélanome productrices de la protéine S100.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants donnés uniquement à titre illustratif et non limitatif, ainsi qu'à l'aide des figures 1 à 3 annexées, sur lesquelles :

Si nécessaire, les lignées cellulaires ont été traitées avec 50µg/ml de cycloheximide sur un dispositif permettant à la fois l'inclinaison et la rotation à 37°C pendant une heure, avant d'effectuer les dosages.

Les cellules viables provenant des lignées cellulaires ont été comptées dans un hématocytomètre après coloration par exclusion au colorant bleu trypan, puis diluées en série dans les puits en double dans un milieu de croissance à différentes concentrations. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C dans du CO<sub>2</sub> à 5% pendant 24 heures.

Après lavage avec du PBS, on a ajouté soit des anticorps monoclonaux anti-Cath-D M1G8 (Garcia, M., Capony, F., Derocq, D., Simon, D., Pau, B., & Rochefort, *supra*) conjugués à la peroxydase de raifort, soit des anticorps monoclonaux anti-CA15-3 DF3 (Dakocytomation) conjugués à la phosphatase alcaline (procédé une couleur), soit un mélange de ceux-ci (procédé à deux couleurs) et les plaques ont été incubées à la température ambiante.

Le substrat chromatique approprié, à savoir kit de coloration AEC (Sigma-aldrich) pour la peroxydase de raifort et mélange de sel de X-phosphate/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate toluidine et de chlorure de 4-Nitro blue tétrazolium (BCIP/NTB, Sigma), a été ajouté dans chaque puits. On a obtenu des précipités insolubles de couleur rouge (peroxydase/présence de Cath-D) ou bleue (phosphatase alcaline/présence de CA15-3) en 5 à 10 minutes.

Les plaques ont ensuite été lavées avec de l'eau distillée pour stopper la réaction.

Les immuno-spots ont été comptés en utilisant l'appareillage KS ELISPOT. Les puits sans cellules ou sans revêtement d'anticorps spécifiques ont été inclus en tant que témoin.

La figure 1 montre les résultats obtenus. Comme montré sur la figure 1 A-B (1A pour Cath-D ; 1B pour CA15-3) où le procédé une couleur a été utilisé, l'utilisation d'une combinaison d'anticorps monoclonaux anti-Cath-D et anti-CA15-3 permet d'observer qu'environ 25% des cellules MCF-7 sécrètent les protéines Cath-D et/ou CA15-3 après 24 heures de culture *in vitro*. L'addition de cycloheximide pendant la culture diminue à la fois la taille et le nombre de spots obtenus, ce qui



Marcy l'Etoile, France) et ont été laissées toute la nuit à +4°C. Les anticorps non liés à la membrane ont été éliminés en lavant trois fois avec du PBS. Les sites non liés ont ensuite été bloqués avec de la sérumalbumine bovine à 5% (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) pendant une heure à la température ambiante.

5 Si nécessaire, les lignées cellulaires ont été traitées avec 50µg/ml de cycloheximide sur un dispositif permettant à la fois l'inclinaison et la rotation à 37°C pendant une heure, avant d'effectuer les dosages.

Les cellules viables provenant des lignées cellulaires ont été comptées dans un hématocytomètre après coloration par exclusion au colorant bleu trypan, puis  
10 diluées en série dans les puits en double dans un milieu de croissance à différentes concentrations. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C dans du CO<sub>2</sub> à 5% pendant 24 heures.

Après lavage avec du PBS, on a ajouté des anticorps monoclonaux anti-PSA (bioMérieux) conjugués à la phosphatase alcaline (procédé une couleur), et les  
15 plaques ont été incubées à la température ambiante.

Le substrat chromatique approprié, à le mélange de sel de X-phosphate/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate toluidine et de chlorure de 4-Nitro blue tétrazolium (BCIP/NTB, Sigma), a été ajouté dans chaque puits. On a obtenu des précipités insolubles de couleur bleue en 5 à 10 minutes.

20 Les plaques ont ensuite été lavées avec de l'eau distillée pour stopper la réaction.

Les immuno-spots ont été comptés en utilisant l'appareillage KS ELISPOT. Les puits sans cellules ou sans revêtement d'anticorps spécifiques ont été inclus en tant que témoin.

25 Il est à noter que l'efficacité de l'isolement des cellules épithéliales a été testée comme indiqué dans l'exemple 3, lequel a été de 70%.

#### Exemple 5 : Détection de cellules circulantes sécrétrices de PSA :

On a isolé des cellules épithéliales circulantes et des cellules  
30 mononucléées périphériques par centrifugation par gradient de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suède), de 8-10 ml d'échantillons sanguins provenant de 10

ont ensuite été bloqués avec de la sérumalbumine bovine à 5% (Sigma-Aldrich, ST Quentin Fallavier, France) pendant une heure à température ambiante.

Les cellules ML-1 ont été comptées dans un hématocytomètre après coloration par exclusion au colorant bleu trypan, puis diluées en série dans les puits en double dans un milieu de croissance adéquat à différentes concentrations. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C dans du CO<sub>2</sub> à 5% pendant 24 heures.

Après lavages avec du PBS, on a ajouté des anticorps monoclonaux anti-TG (BioRad, Marnes la Coquette, France) conjugués à la phosphatase alcaline (procédé une couleur), et les plaques ont été incubées à température ambiante.

Le substrat chromatique approprié (mélange de sel de X-phosphate/5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate toluidine et de chlorure de 4-Nitro blue tétrazolium (BCIP/NTB, Sigma) a été ajouté dans chaque puits. On a obtenu des précipités insolubles de couleur bleue en 5 à 10 minutes.

Les plaques ont ensuite été lavées avec de l'eau distillée pour stopper la réaction.

Les immuno-spots ont été comptés en utilisant l'appareillage KS ELISPOT. Les puits sans cellules ou sans revêtement d'anticorps spécifiques ont été inclus en tant que témoin.

Il est à noter que l'efficacité de l'isolement des cellules épithéliales a été testée comme indiqué dans l'exemple 3, lequel a été de 70%.

#### Exemple 7 : Détection de cellules circulantes sécrétrices de TG:

On a isolé des cellules épithéliales circulantes et des cellules mononucléées périphériques par centrifugation par gradient de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suède), de 8-10 ml d'échantillons sanguins provenant de 15 patients présentant un cancer de la thyroïde métastatique traités à l'hôpital Lapeyronie au CHU de Montpellier, France.

On a enrichi les cellules non hématopoïétiques par déplétion de toutes les cellules sanguines CD45(+) de lignée hématopoïétique provenant des cellules mononucléées périphériques en utilisant des anticorps anti-CD45 avec un marquage magnétique et un procédé de séparation magnétique selon les recommandations de

CA125 (Dakocytomation) conjugués à la phosphatase alcaline (procédé une couleur), et les plaques ont été incubées à température ambiante.

Le substrat chromatique approprié (mélange de sel de X-phosphate/5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate toluidine et de chlorure de 4-Nitro blue tétrazolium (BCIP/NTB, Sigma)) a été ajouté dans chaque puits. On a obtenu des précipités insolubles de couleur bleue en 5 à 10 minutes.

Les plaques ont ensuite été lavées avec de l'eau distillée pour stopper la réaction.

Les immuno-spots ont été comptés en utilisant l'appareillage KS ELISPOT. Les puits sans cellules ou sans revêtement d'anticorps spécifiques ont été inclus en tant que témoin.

Il est à noter que l'efficacité de l'isolement des cellules épithéliales a été testée comme indiqué dans l'exemple 3, lequel a été de 70%.

Exemple 9 : Dénombrement des cellules tumorales provenant des lignées cellulaires tumorales Caco2 et HT-29 (cancer colorectal)

On a utilisé les lignées Caco2 et HT-29 car elles sécrètent des niveaux élevés des protéines CA 19-9 et ACE. Les deux lignées cellulaires ont été testées pour les deux marqueurs tumoraux.

La lignée cellulaire Caco2 a été maintenue dans un milieu MEM avec des sels de Earles et des acides aminés non essentiels, additionné de sérum de veau fœtal (20%), de glutamine (2mM), de pyruvate de sodium (1 mM) et de bicarbonate de sodium (1,5 g/l).

La lignée cellulaire HT-29 a été maintenue dans un milieu du milieu McCoy's 5a contenant de la glutamine (1,5 mM) et du sérum de veau fœtal (10%).

Des plaques de microtitrage de 96 puits (Nunc, Roskilde, Danemark) utilisant une membrane de Immobilon-P comme phase solide (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) ont été revêtues d'anticorps monoclonaux anti-CA 19-9 (Dakocytomation) ou anti-ACE (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et ont été laissées toute la nuit à +4°C. Les anticorps non liés à la membrane ont été éliminés en lavant trois fois avec du PBS. Les sites non liés ont ensuite été bloqués avec de la

Des plaques de microtitrage de 96 puits (Nunc, Roskilde, Danemark) utilisant une membrane de Immobilon-P comme phase solide (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) ont été revêtues d'anticorps monoclonaux anti-CA125 (Dakocytomation) et ont été laissées toute la nuit à +4°C. Les anticorps non liés à la membrane ont été éliminés en lavant trois fois avec du PBS. Les sites non liés ont ensuite été bloqués avec de la sérum-albumine bovine à 5% (Sigma-Aldrich, ST Quentin Fallavier, France) pendant une heure à température ambiante.

Les cellules ont été comptées dans un hématocytomètre après coloration par exclusion au colorant bleu trypan, puis diluées en série dans les puits en double dans un milieu de croissance adéquat à différentes concentrations. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C dans du CO<sub>2</sub> à 5% pendant 24 heures.

Après lavages avec du PBS, on a ajouté des anticorps monoclonaux anti-AFP (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) conjugués à la peroxydase (procédé une couleur), et les plaques ont été incubées à température ambiante.

Le substrat chromatique approprié pour la peroxydase, à savoir le kit de coloration AEC (Sigma-Aldrich), a été ajouté dans chaque puits. On a obtenu des précipités insolubles de couleur rouge en 10 minutes.

Les plaques ont ensuite été lavées avec de l'eau distillée pour stopper la réaction.

Les immuno-spots ont été comptés en utilisant l'appareillage KS ELISPOT. Les puits sans cellules ou sans revêtement d'anticorps spécifiques ont été inclus en tant que témoin.

Il est à noter que l'efficacité de l'isolement des cellules épithéliales a été testée comme indiqué dans l'exemple 3, lequel a été de 70%.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les cellules tumorales sont capables de sécréter comme marqueur tumoral l'antigène PSA, et le partenaire de liaison est un anticorps anti-PSA.

5 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les cellules tumorales sont capables de relarguer comme marqueur tumoral l'antigène protéique CA15-3, et le partenaire de liaison est un anticorps anti-CA15-3.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce  
10 que les cellules tumorales sont capables de sécréter comme marqueur tumoral l'antigène protéique TG, et le partenaire de liaison est un anticorps anti-TG.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce  
que les cellules tumorales sont capables de sécréter comme marqueur tumoral  
15 l'antigène protéique CA 125, et le partenaire de liaison est un anticorps anti-CA 125.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce  
que les cellules tumorales sont capables de sécréter comme marqueur tumoral les  
antigènes protéiques ACE et/ou CA 19-9, et les partenaires de liaison sont les anticorps  
20 anti-ACE et anti-CA19-9.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce  
que les cellules tumorales sont capables de sécréter comme marqueur tumoral  
l'antigène protéique alpha foetoprotéine, et le partenaire de liaison est un anticorps anti-  
25 AFP.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce  
que les partenaires de liaison sont au nombre de deux et sont de préférence des  
anticorps anti-CA15-3 et anti-Cath-D.

20. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour évaluer le potentiel de survie des cellules tumorales circulantes issues de patients atteints de cancers solides.

- 5           21. Kit de diagnostic pour la mise en œuvre du procédé selon l'une des quelconque des revendications 1 à 12, comprenant une surface de culture préalablement revêtue d'un ou plusieurs partenaires de liaison des marqueurs tumoraux spécifiques du cancer dont on veut effectuer la recherche, le ou les conjugués correspondants préalablement marqués.

FIGURE 1A

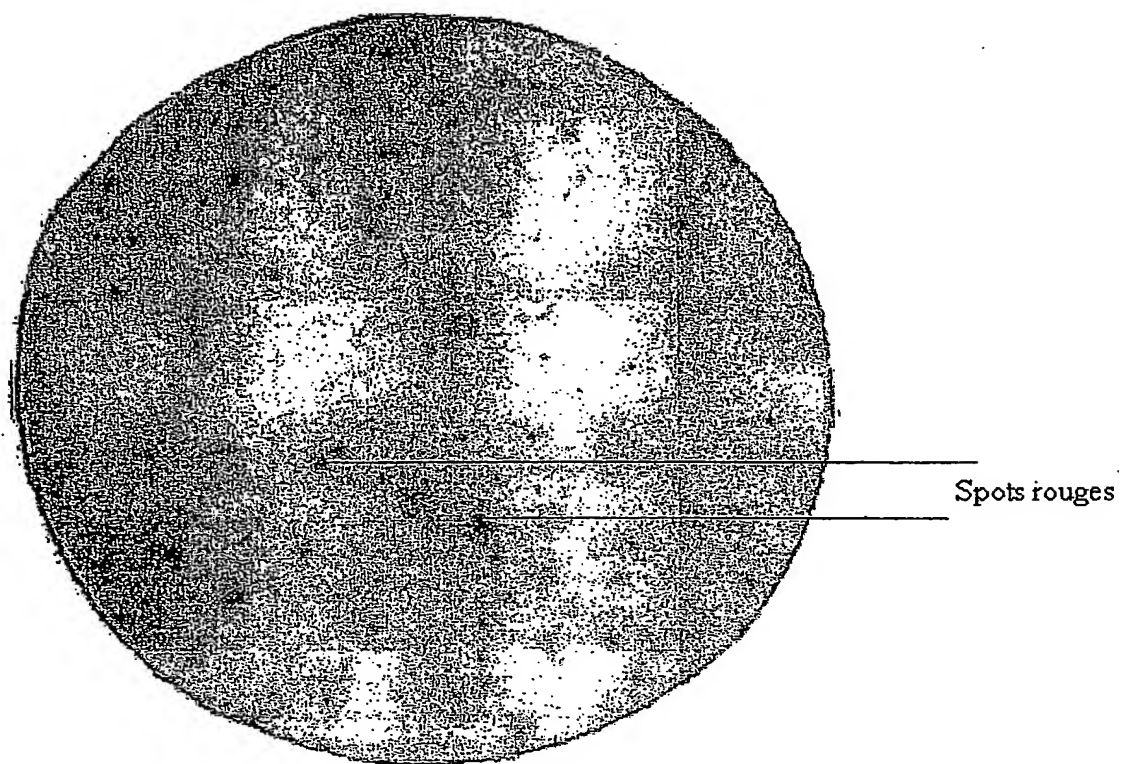


FIGURE 1B

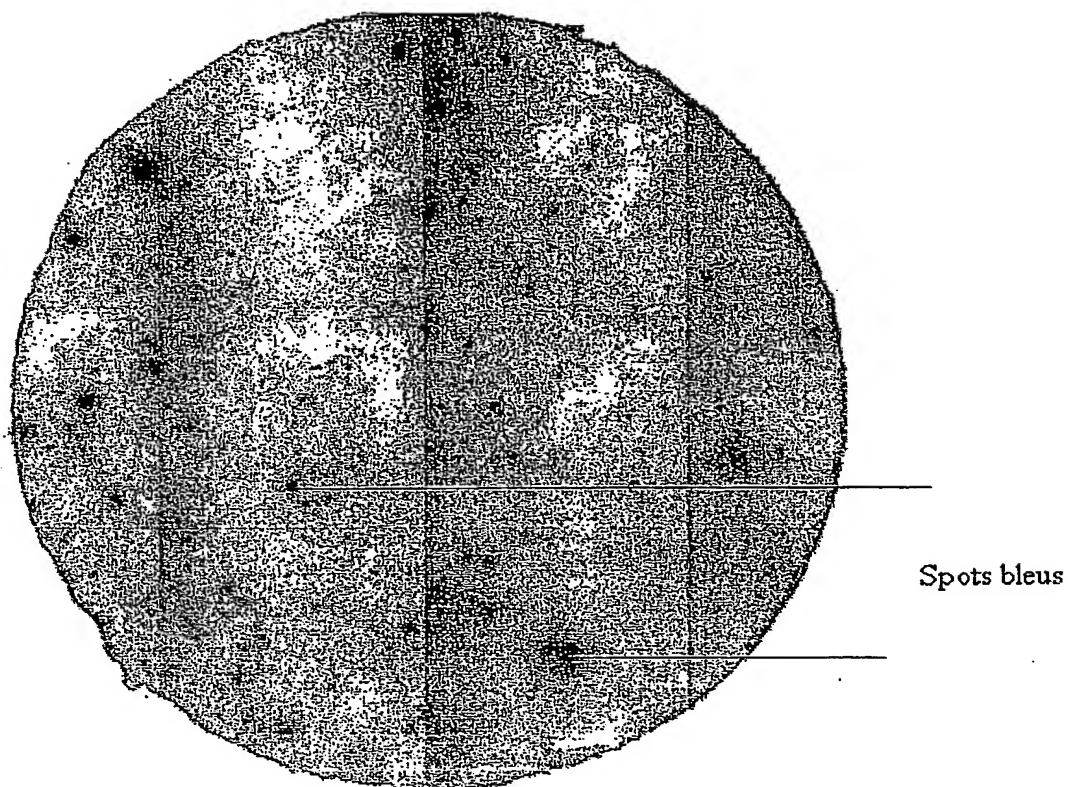




FIGURE 1C

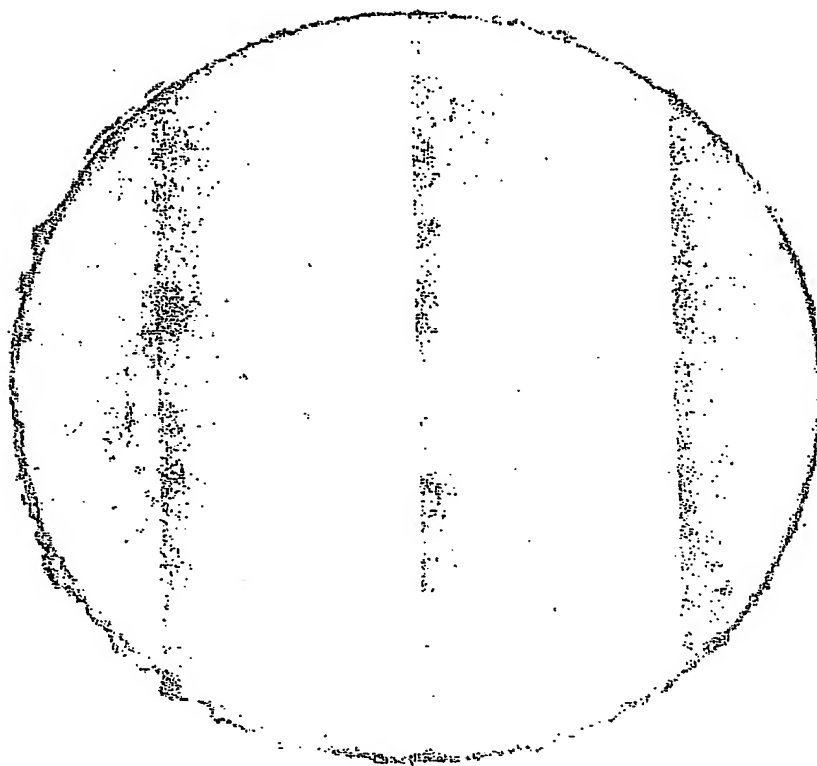


FIGURE 1D

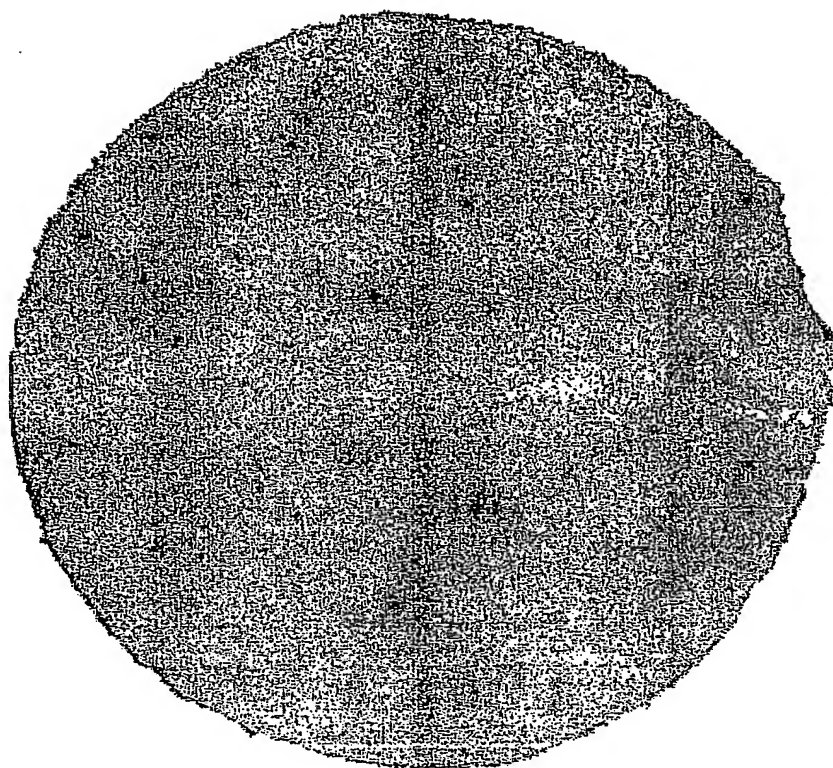


FIGURE 1E

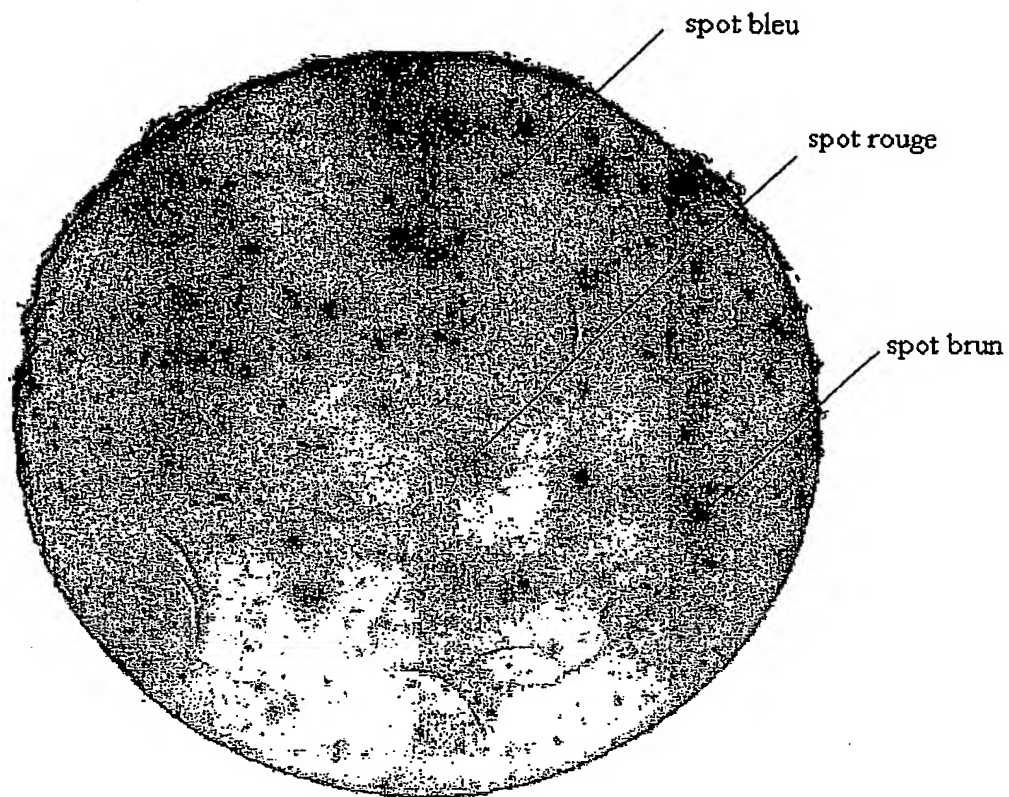


FIGURE 1F

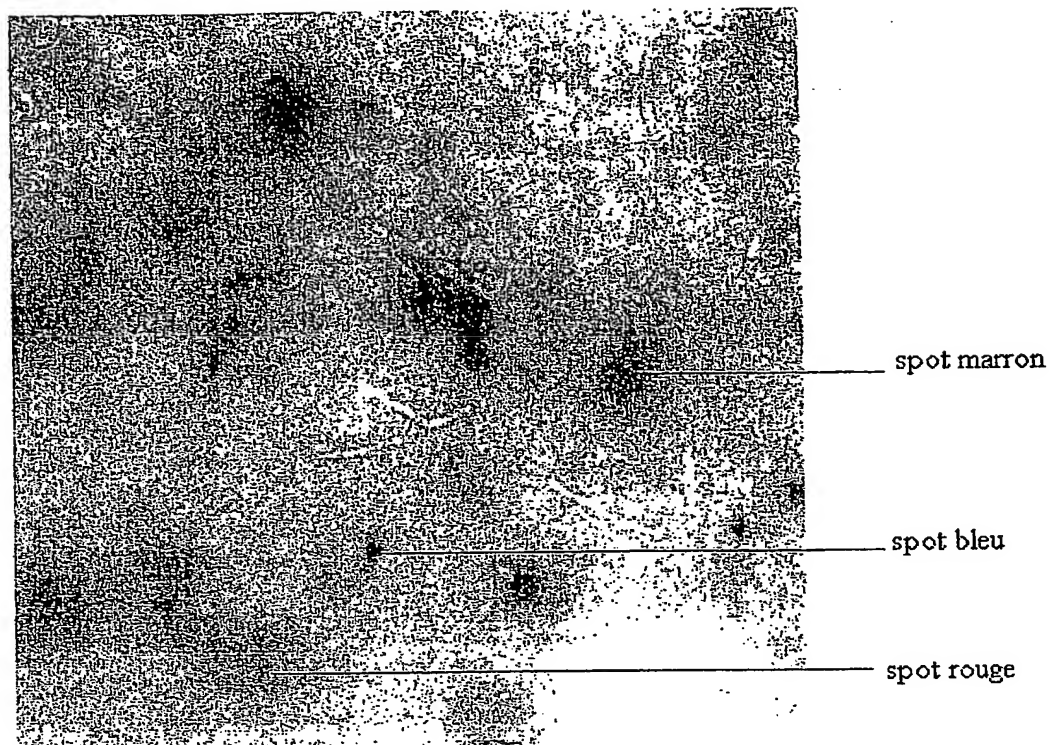


FIGURE 2.

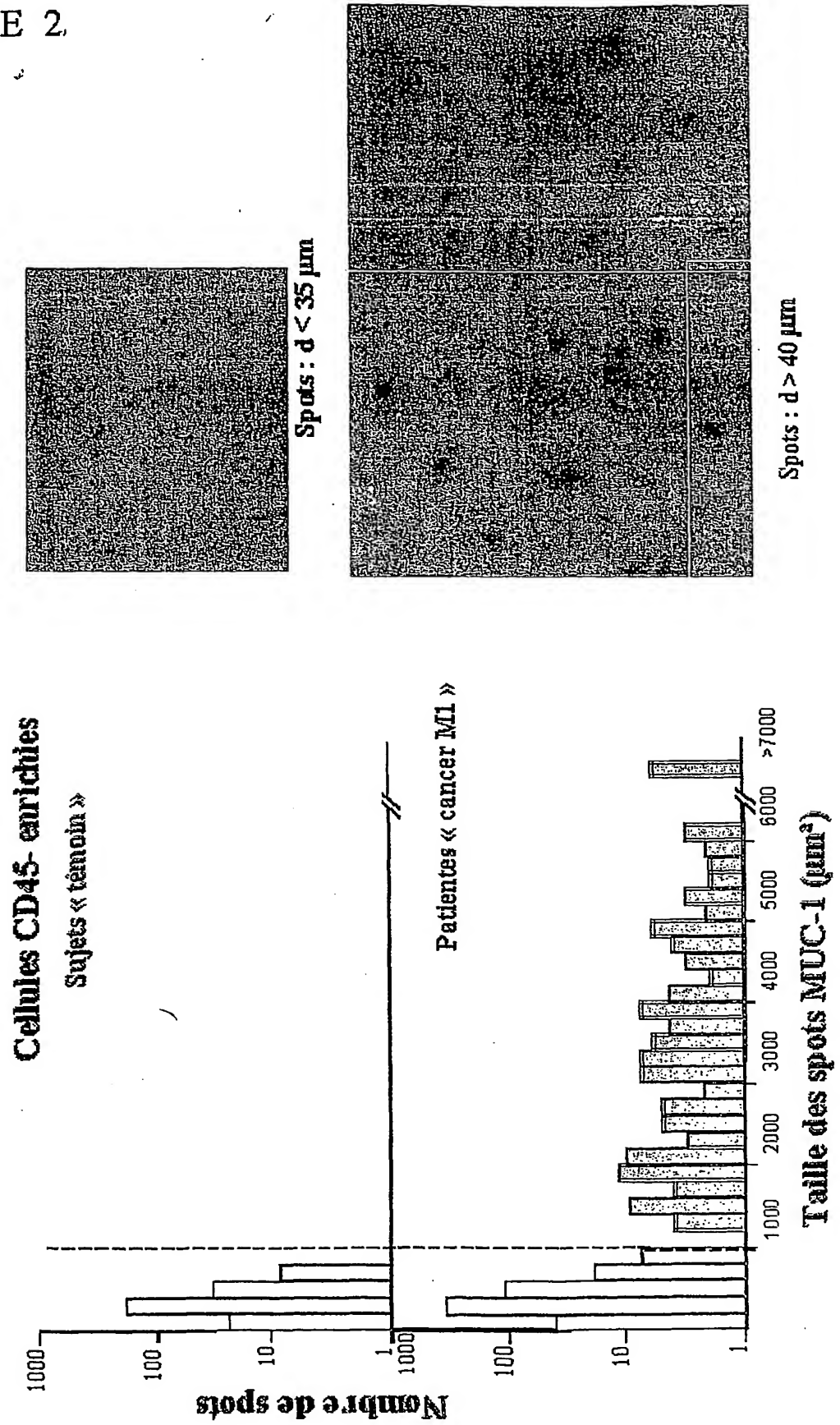
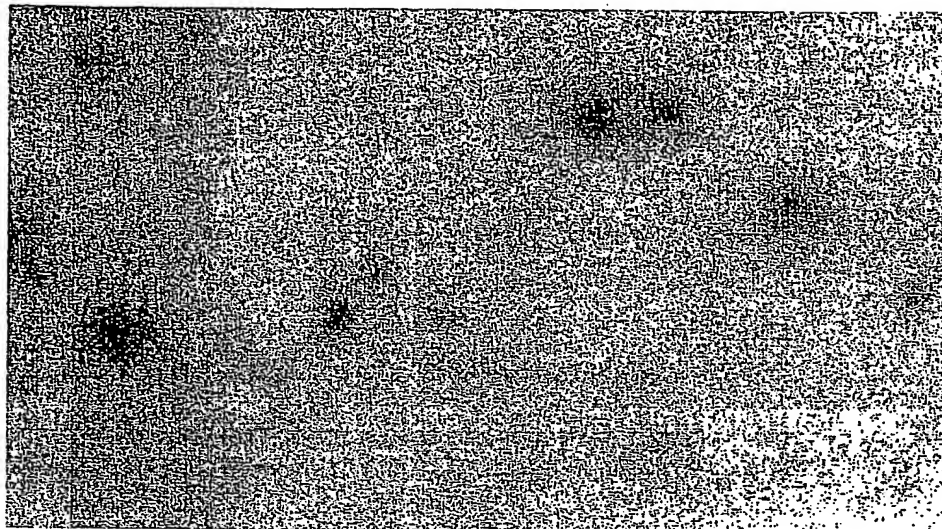


FIGURE 3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**